



Identificación de posibles factores de *Myzus persicae* implicados en la transmisión del virus del grabado del tabaco (TEV) y estrategias para interferir su expresión

María Urizarna España

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

CENTRE DE RECERCA EN AGRIGENÒMICA (CRAG)
DEPARTAMENTO GENÉTICA MOLECULAR

IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES FACTORES DE MYZUS PERSICAE
IMPLICADOS EN LA TRANSMISIÓN DEL VIRUS DEL GRABADO DEL
TABACO (TEV) Y ESTRATEGIAS PARA INTERFERIR SU EXPRESIÓN

MARÍA URIZARNA ESPAÑA
2012

ÍNDICE

RESUMEN	5
SUMMARY	9
INTRODUCTION	21
THE CHALLENGE OF INTERFERING WITH PLANT VIRUS TRANSMISSION	21
1. MODES OF TRANSMISSION	23
2. MAIN GROUPS OF INSECT VECTORS OF PLANT VIRUSES.	26
2.1. - APHIDS	26
2.2. - WHITEFLIES	27
2.3. - LEAFHOPPERS	28
2.4. - OTHER INSECT VECTORS	28
3. CONTROL OF INSECT VECTORS FOR CONTROLLING VIRUS DISEASES	29
3.1. - INTERFERENCE WITH TRANSMISSION	31
4. PLANT POTYVIRUSES TRANSMISSION	35
4.1- THE POTYVIRIDAE FAMILY	35
4.2. - POTYVIRUS GENUS	37
4.3. - BRIDGE HYPOTHESIS FOR NON PERSISTENT TRANSMISSION	44
4.4.- TOBACCO ETCH VIRUS, A POTYVIRUS MODEL FOR TRANSMISSION STUDIES	46
4.5.- THE GREEN PEACH APHID, <i>Myzus persicae</i> , AS VECTOR OF TEV.	46
4.6.- HYPOTHETICAL VIRUS RECEPTORS IN APHID VECTORS.	48
5. INTERFERENCE WITH GENE EXPRESSION IN VECTOR ORGANISMS AND VIRUS TRANSMISSION	49
5.1- ANTECEDENTS OF INTERFERENCE WITH GENE EXPRESSION IN APHIDS, AND POTENTIAL APPLICATIONS	49
OBJETIVOS	53

MATERIALES Y MÉTODOS	57
1. MATERIAL BIOLÓGICO	57
1.1.- AISLADOS VIRALES	57
1.2.- CEPAS BACTERIANAS	58
1.3.- LEVADURAS	59
2. MANIPULACIÓN DE VIRUS Y MICROORGANISMOS	59
2.1.- INOCULACIÓN MECÁNICA DEL VIRUS TEV PARA SU MANTENIMIENTO Y PROPAGACIÓN	59
2.2.- MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS	59
3. PLÁSMIDOS	64
3.1. PLÁSMIDOS GENERADOS Y CONSTRUCCIONES EMPLEADAS PARA LA SOBREEXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN BACTERIA	64
3.2.- PLÁSMIDOS GENERADOS Y CONSTRUCCIONES EMPLEADAS PARA LA EXPRESIÓN TRANSITORIA EN PLANTA DE PRODUCTOS VIRALES (AGROINFILTRACIÓN)	65
3.3.- PLÁSMIDOS GENERADOS Y CONSTRUCCIONES EMPLEADAS PARA LA EXPRESIÓN TRANSITORIA EN PLANTA DE PRODUCTOS DE PULGÓN A TRAVÉS DEL VECTOR VIRAL TRV.	67
3.4. PLÁSMIDOS GENERADOS Y CONSTRUCCIONES EMPLEADAS PARA ENSAYOS DE INTERACCIÓN DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURAS (MATING).	68
3.5. PLÁSMIDOS GENERADOS Y CONSTRUCCIONES EMPLEADAS PARA ENSAYOS DE INTERFERENCIA DE GENES DE PULGÓN.	69
4. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	70
4.1. EXTRACCIONES DE ÁCIDOS NUCLEICOS TOTALES DE TEJIDO DE PLANTAS AGROINFILTRADAS O AGROINOCULADAS	70
4.2.- EXTRACCIONES DE RNA DE TEJIDO DE PLANTAS INFECTADAS Y PULGÓN.	71
4.3.- AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS DE RNA POR RT- PCR.	71
4.4.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).	72
4.5.- PCR EN TIEMPO REAL (qPCR).	72
4.6.- SÍNTESIS DE RNA DE DOBLE CADENA PARA LA DIETA ARTIFICIAL.	74

5. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS	76
5.1.- EXPRESIÓN EN BACTERIA DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN GST/MBP-CP-TEV Y GST/MBP-MPRPS2	76
5.2.- EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA HCPRO A PARTIR DE PLANTAS INFECTADAS	76
5.3.- PURIFICACIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES DE TEV	77
5.4.- ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS PARA POSTERIOR ENSAYO DE INTERACCIÓN PROTEÍNA- PROTEÍNA	78
5.5.- INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT)	79
5.6.- ANÁLISIS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA- PROTEÍNA MEDIANTE FAR-WESTERN BLOT	80
5.7.- ENSAYOS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA- PROTEÍNA MEDIANTE EL SISTEMA DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURAS.	80
6. MYZUS PERSICAE (VECTOR DE TRANSMISIÓN VIRAL)	82
6.1.- IDENTIFICACIÓN DE CANDIDATOS A RECEPTOR EN PULGÓN	82
6.2.- LOCALIZACIÓN IN SITU DE PROTEÍNAS EN EL ESTILETE DEL PULGÓN.	85
6.3.- MEDIDA DE PARÁMETROS VITALES EN EL CICLO DE UN PULGÓN	89
6.4.- ENSAYOS DE INTERFERENCIA EN GENES CANDIDATOS DE PULGÓN	89
6.5.- TRANSMISIÓN POR PULGONES	94
7. APLICACIONES BIOINFORMÁTICAS	94
RESULTADOS	99
1. INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA ENTRE EL FACTOR DE TRANSMISIÓN DE TEV Y UN POSIBLE RECEPTOR DEL PULGÓN	99
1.1.- SOBREENPRESIÓN DE CP DE TEV Y PRODUCCIÓN DE ANTISUERO CONTRA LA MISMA.	99
1.2.- SOBREENPRESIÓN DE MPRPS2 Y PRODUCCIÓN DE ANTISUERO CONTRA LA MISMA.	105
1.3.- OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA HCPRO DE TEV Y SUS MUTANTES EITC Y PAK.	110
1.4.- ESTUDIO DE INTERACCIÓN DE HCPRO DE TEV CON LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDE Y CON UN POSIBLE RECEPTOR DEL VECTOR DE TRANSMISIÓN MEDIANTE ENSAYOS DE FAR WESTERN BLOT.	113

1.5.- ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DEL FACTOR HCPRO DE TEV CON CP DE TEV Y MPRPS2 MEDIANTE EL SISTEMA DEL DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURA.	116
2. BÚSQUEDA DEL CANDIDATO A RECEPTOR MPRPS2 MEDIANTE INMUNOLocalIZACIÓN ESPECÍFICA EN EL ESTILETE DEL PULGÓN.	119
3. IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE NUEVOS CANDIDATOS A RECEPTOR A PARTIR DEL INTERACTOMA DE HCPRO CON PROTEÍNAS DE PULGÓN VECTOR.	125
3.1.- ELECTROFORESIS UNIDIMENSIONAL DE EXTRACTOS DE PROTEÍNAS DE PULGÓN E INTERACTOMA DE ÉSTOS CON LA PROTEÍNA HCPRO.	126
3.2.- ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DE EXTRACTOS DE PROTEÍNAS DE PULGÓN E INTERACTOMA DE ÉSTOS CON LA PROTEÍNA HCPRO Y LA VARIANTE MUTANTE EITC.	127
3.3.- IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE PULGÓN QUE INTERACCIONAN CON EL FACTOR VIRAL HCPRO.	130
3.4.- IDENTIFICACIÓN Y ELECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE PULGÓN UTILIZANDO LAS SECUENCIAS DE LOS PÉPTIDOS OBTENIDOS EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS.	132
3.5.- IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE PULGÓN QUE DEJAN DE INTERACCIONAR CON EL MUTANTE DE HCPRO, EITC.	133
3.6.- IDENTIFICACIÓN DE M _p RPS2 EN EL EXTRACTO ENRIQUECIDO DE PROTEÍNAS CUTICULARES DE PULGÓN.	135
4. ESTUDIO DE DIFERENTES PARÁMETROS DEL CICLO VITAL DE UNA POBLACIÓN M. PERSICAE EN TABACO BAJO CONDICIONES ESPECÍFICAS.	136
4.1.- ESTUDIO DEL CICLO VITAL	136
4.2.- MEDIDA DE LA CÁPSULA CEFÁLICA EN LOS DIFERENTES ESTADÍOS DEL CICLO VITAL DEL PULGÓN.	137
4.3.- EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS CANDIDATOS A RECEPTOR MPRPS2 Y MPRR1CP2 A LO LARGO DEL CICLO VITAL DEL PULGÓN.	138
5. DESARROLLO DE METODOLOGÍAS DE SILENCIAMIENTO DE GENES DE PULGÓN A TRAVÉS DE DISTINTAS TÉCNICAS BASADAS EN LA ALIMENTACIÓN.	139
5.1.- EVALUACIÓN DE LA DIETA ARTIFICIAL COMO MÉTODO DE SILENCIAMIENTO DE GENES DE PULGÓN	139
5.2.- USO DE VECTORES VIRALES VIGS EN PLANTAS PARA ALIMENTACIÓN DEL INSECTO SOBRE EL TEJIDO INFECTADO.	142

6. ENSAYOS DE TRANSMISIÓN CON PULGONES ALIMENTADOS SOBRE PLANTAS AGROINOCULADAS CON VECTORES VIRALES DISEÑADOS PARA INTERFERIR LA EXPRESIÓN DE GENES ESPECÍFICOS.	150
DISCUSIÓN	155
1. INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA ENTRE EL FACTOR DE TRANSMISIÓN DE TEV Y UN POSIBLE RECEPTOR DEL PULGÓN	155
1.1.- SOBREEXPRESIÓN DE CP DE TEV y MpRPS2 Y PRODUCCIÓN DE ANTISUEROS CONTRA LAS MISMAS.	155
1.2.- OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA HCPRO DE TEV Y SUS MUTANTES EITC Y PAK.	157
1.3.- INTERACCIÓN DE HCPRO DE TEV CON LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDE Y CON UN POSIBLE RECEPTOR DEL VECTOR DE TRANSMISIÓN MEDIANTE ENSAYOS DE FAR WESTERN BLOT.	158
1.4.- INTERACCIÓN DEL FACTOR HCPRO DE TEV CON LA CP DE TEV Y CON MpRPS2 MEDIANTE EL SISTEMA DEL DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURA.	159
2. INTENTOS DE LOCALIZACIÓN DEL CANDIDATO A RECEPTOR MPRPS2 EN EL ESTILETE DEL PULGÓN.	162
2.1.- INTENTO DE LOCALIZACIÓN DE MPRPS2 A TRAVÉS DE LA INTERACCIÓN CON HCPRO-GFP EN PRESENCIA DE EGTA	164
2.2.- LOCALIZACIÓN DE MPRPS2 A TRAVÉS DE LA INCUBACIÓN DE LA PROTEÍNA PURIFICADA GST- MPRPS2 EN LOS ESTILETES.	165
2.3.- LOCALIZACIÓN DE MPRPS2 EN DOS CONDICIONES DE pH DIFERENTES.	165
2.4.- LOCALIZACIÓN DE MPRPS2 CAMBIANDO LA CONDICIONES DE PH DE HCPRO	166
3. IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE NUEVOS CANDIDATOS A RECEPTOR A PARTIR DEL INTERACTOMA DE HCPRO CON PROTEÍNAS DE PULGÓN.	166
4. PARÁMETROS DEL CICLO VITAL DE UNA POBLACIÓN DE M. PERSICAE BAJO CONDICIONES ESPECÍFICAS DE MANTENIMIENTO EN TABACO Y EN EL LABORATORIO.	170
5. DESARROLLO DE METODOLOGÍAS DE SILENCIAMIENTO DE GENES DE PULGÓN A TRAVÉS DE DISTINTAS TÉCNICAS BASADAS EN LA ALIMENTACIÓN.	173
6. ENSAYOS DE TRANSMISIÓN CON PULGONES ALIMENTADOS SOBRE PLANTAS AGROINOCULADAS CON VECTORES VIRALES DISEÑADOS PARA INTERFERIR LA EXPRESIÓN DE GENES ESPECÍFICOS.	176

CONCLUSIONES	181
CONCLUSIONS	185
BIBLIOGRAFÍA	189